

PCT/JP00/01353

06.03.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/01353

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 8月26日

RECD 25 APR 2000

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第240041号

出 願 人
Applicant(s):

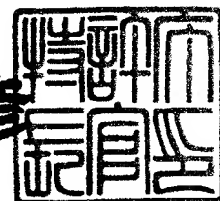
三菱レイヨン株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3023368

特平 11-240041

【書類名】 特許願

【整理番号】 P110401000

【提出日】 平成11年 8月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/11

【発明者】

【住所又は居所】 広島県大竹市御幸町 20番1号 三菱レイヨン株式会社
中央技術研究所内

【氏名】 秋田 隆

【発明者】

【住所又は居所】 広島県大竹市御幸町 20番1号 三菱レイヨン株式会社
中央技術研究所内

【氏名】 伊藤 千穂

【発明者】

【住所又は居所】 広島県大竹市御幸町 20番1号 三菱レイヨン株式会社
中央技術研究所内

【氏名】 石丸 輝太

【発明者】

【住所又は居所】 広島県大竹市御幸町 20番1号 三菱レイヨン株式会社
中央技術研究所内

【氏名】 村瀬 圭

【発明者】

【住所又は居所】 広島県大竹市御幸町 20番1号 三菱レイヨン株式会社
中央技術研究所内

【氏名】 隅 敏則

【発明者】

【住所又は居所】 広島県大竹市御幸町 20番1号 三菱レイヨン株式会社
中央技術研究所内

【氏名】 前原 修

特平 1 1 - 2 4 0 0 4 1

【特許出願人】

【識別番号】 000006035
【氏名又は名称】 三菱レイヨン株式会社
【代表者】 田口 栄一

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010054
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生体高分子配列薄片の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 中空繊維を複数本束ねて配列体とし、次いで該配列体を構成する各中空繊維の内壁部及び／又は中空部に生体高分子を固定化させた後、該生体高分子固定化配列体を繊維軸と交差する方向にスライスすることを特徴とする生体高分子配列薄片の製造方法。

【請求項 2】 多孔質中空繊維を複数本束ねて配列体とし、次いで該配列体を構成する各多孔質中空繊維の内壁部、中空部及び／又は多孔質部に生体高分子を固定化させた後、該生体高分子固定化配列体を繊維軸と交差する方向にスライスすることを特徴とする生体高分子配列薄片の製造方法。

【請求項 3】 配列体を構成する各中空繊維の内壁部及び／又は中空部への生体高分子の固定化を、該配列体を構成する各中空繊維の延長部分の先端を生体高分子を含む液に浸漬し、該液を該配列体を構成する各中空繊維の中空部に導入することにより行う請求項 1 記載の生体高分子配列薄片の製造方法。

【請求項 4】 配列体を構成する各多孔質中空繊維の内壁部、中空部及び／又は多孔質壁部への生体高分子の固定化を、該配列体を構成する各多孔質中空繊維の延長部分の先端を生体高分子を含む液に浸漬し、該液を該配列体を構成する各多孔質中空繊維の中空部及び／又は多孔質部に導入することにより行う請求項 2 記載の生体高分子配列薄片の製造方法。

【請求項 5】 配列体中の中空繊維又は多孔質中空繊維が規則的に配列されたものである請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の生体高分子配列薄片の製造方法。

【請求項 6】 配列体が該配列体を構成する中空繊維又は多孔質中空繊維の軸方向に対して垂直な断面 1 cm^2 当たり 100 本以上の中空繊維又は多孔質中空繊維を含むものである請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の生体高分子配列薄片の製造方法。

【請求項 7】 生体高分子が核酸である請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の生体高分子配列薄片の製造方法。

【請求項 8】 核酸の種類が、配列体を構成する各中空繊維又は各多孔質中空繊維の全部又は一部において異なるものである請求項 7 記載の生体高分子配列薄片の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床検査、食品検査等の分野などに利用できる核酸、蛋白質、多糖類などの生体高分子が固定化された高分子材料の製造方法に関する。詳しくは、中空繊維又は多孔質中空繊維を用いた該生体高分子が整然と配列されて固定化された生体高分子配列薄片の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、各種生物におけるゲノムプロジェクトが進められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子の機能については、各種の方法で調べることができるが、その有力な方法の一つとして、明らかにされた塩基配列情報を利用した遺伝子発現解析が知られている。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションに代表されるような、各種の核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応や各種のPCR反応を利用した方法が開発され、当該方法により各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。しかしながら、これらの方法では適用し得る遺伝子の数に制限がある。したがって、今日のゲノムプロジェクトを通して明らかにされつつあるような、一単位レベルという極めて多数の遺伝子から構成される複雑な反応系全体からみると、上記方法により遺伝子の総合的・系統的解析を行うことは困難である。

【0003】

最近になって、多数遺伝子の一括発現解析を可能とするDNAマイクロアレイ法（DNAチップ法）と呼ばれる新しい分析法、ないし方法論が開発され、注目を集めている。

これらの方法は、いずれも核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応に基づく

核酸検出・定量法である点で原理的には従来の方法と同じであるが、マイクロアレイ又はチップと呼ばれる平面基盤片上に、多数のDNA断片が高密度に整列固定化されたものが用いられている点に大きな特徴がある。マイクロアレイ法の具体的使用法としては、例えば、研究対象細胞の発現遺伝子等を蛍光色素等で標識したサンプルを平面基盤片上でハイブリダイゼーションさせ、互いに相補的な核酸（DNAあるいはRNA）同士を結合させ、その箇所を蛍光色素等でラベル後、高解像度解析装置で高速に読みとる方法が挙げられる。こうして、サンプル中のそれぞれの遺伝子量を迅速に推定できる。即ち、この新しい方法の本質は、基本的には反応試料の微量化と、その反応試料を再現性よく多量・迅速・系統的に分析、定量しうる形に配列・整列する技術との統合であると理解される。

【0004】

核酸を基盤上に固定化するための技術としては、上記ノーザン法同様、ナイロシート等の上に高密度に固定化する方法の他、更に密度を高めるため、ガラス等の基盤の上にポリリジン等をコーティングして固定化する方法、あるいはシリコン等の基盤の上に短鎖の核酸を直接固相合成していく方法などが開発されている。

【0005】

しかし、例えば、ガラス等の固体表面を化学的又は物理的に修飾した基盤上に核酸をスポッティング固定化する方法[Science 270, 467-470(1995)]は、スポット密度でシート法より優れるものの、スポット密度及びスポット当たり固定できる核酸量がシリコン基盤上における直接合成法(U.S. Patent 5,445,934、U.S. Patent 5,774,305)と比較して少量であり、再現が困難である点が指摘されている。他方、シリコン等の基盤の上にフォトリソグラフィー技術を用い、多種の短鎖核酸をその場で規則正しく固相合成していく方法に関しては、単位面積あたりに合成しうる核酸種数（スポット密度）及びスポット当たりの固定化量（合成量）、並びに再現性等において、スポッティング法より優れるとされるものの、固定化しうる化合物種は、フォトリソグラフィーにより制御可能な比較的短鎖の核酸に限られる。さらに、高価な製造装置と多段の製造プロセスにより、チップ当たりの大きなコストダウンが困難とされる。その他、微小な担体上に核酸を固相合

成しライブラリー化する手法として、微小なビーズを利用する方法が知られている。この方法は、チップ法より長鎖の核酸を多種・安価に合成することが可能であり、また cDNA 等より長鎖の核酸も固定可能と考えられる。しかしながら、チップ法と異なり、指定の化合物を指定の配列基準で再現性よく整列させたものを作製することは困難である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

このような状況下、分子の大きさによらず、核酸、蛋白質、多糖類などの生体高分子を、所定の濃度に固定化でき、測定可能な形に高密度に再現よく配列化可能で、安価な大量製造に適応しうる新たな体系的な方法論の確立は、今後重要性を増すと考えられる遺伝子解析に強く求められるものであり、本発明が解決しようとする課題である。

【0007】

具体的には、本発明が解決しようとする課題は、ナイロンシートやガラス基盤のような二次元担体上への微量スポッティングや微量分注による生体高分子配列体製造法に比べ、生体高分子固定化量が高く、単位面積あたり配列される生体高分子の分子種の高密度化が可能で、大量生産により適した配列体、すなわち生体高分子が固定化された二次元的（平面的）配列体（固定化生体高分子二次元配列体）の製造法の確立である。また、本発明が解決しようとする課題は、例えば生体高分子として核酸を例にとった場合、シリコン基盤上へのフォトリソグラフィと固相合成との組み合わせによる高密度オリゴ核酸配列体製造法と比べ、cDNA を含む長鎖の核酸にも適応可能で、製造コストのより低い固定化核酸二次元配列体製造法の確立である。

そこで、本発明は、核酸、蛋白質、ポリペプチド、多糖類などの生体高分子が整然と配列されて固定化された薄片の効率的な製造方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上述の如き課題を解決すべく、鋭意検討を重ねた結果、生体

高分子整列化プロセスと固定化プロセスとを同一の二次元担体上で行う従来法の発想を改め、まず、繊維賦形技術により中空繊維の三次元配列体を作製し、この配列体に効率的に生体高分子を導入、固定化することにより、生体高分子が整列して配列された三次元構造体を得、その構造体の切断薄片化プロセスを経ること、固定化生体高分子二次元高密度配列体薄片を作製し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は、中空繊維を複数本束ねて配列体とし、次いで該配列体を構成する各中空繊維の内壁部及び／又は中空部に生体高分子を固定化させた後、該生体高分子固定化配列体を繊維軸と交差する方向にスライスすることを特徴とする生体高分子配列薄片の製造方法である。

上記配列体を構成する各中空繊維の内壁部及び／又は中空部への生体高分子の固定化は、例えば、該配列体を構成する各中空繊維の延長部分の先端を生体高分子を含む液に浸漬し、該液を該配列体を構成する各中空繊維の中空部に導入することにより行うことができる。

【0010】

さらに、本発明は、多孔質中空繊維を複数本束ねて配列体とし、次いで該配列体を構成する各多孔質中空繊維の内壁部、中空部及び／又は多孔質部に生体高分子を固定化させた後、該生体高分子固定化配列体を繊維軸と交差する方向にスライスすることを特徴とする生体高分子配列薄片の製造方法である。

上記配列体を構成する各多孔質中空繊維の内壁部、中空部及び／又は多孔質部への生体高分子の固定化は、例えば、該配列体を構成する各多孔質中空繊維の延長部分の先端を生体高分子を含む液に浸漬し、該液を該配列体を構成する各多孔質中空繊維の中空部及び／又は多孔質部に導入することにより行うことができる。

【0011】

これら配列体としては、例えば、中空繊維又は多孔質中空繊維が規則的に配列されたもの、あるいは、該配列体を構成する中空繊維又は多孔質中空繊維の軸方向に対して垂直な断面 1 cm^2 当たり 100 本以上の中空繊維又は多孔質中空

繊維を含むものなどが挙げられる。

また、生体高分子として、例えば、核酸が挙げられる。

この核酸の種類は、配列体を構成する各中空繊維又は各多孔質中空繊維の全部又は一部において異なってもよい。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において、中空繊維あるいは多孔質中空繊維に固定化する対象となる生体高分子としては、デオキシリボ核酸（DNA）やリボ核酸（RNA）、ペプチド核酸（PNA）、オキシペプチド核酸（OPNA）などの核酸、あるいは、蛋白質、多糖類などが挙げられる。本発明に用いる生体高分子は、市販のものでもよく、また、生細胞などから得られたものでもよい。

【0013】

例えば、生体高分子として核酸を用いる場合には、生細胞からのDNA又はRNAの調製は、公知の方法、例えばDNAの抽出については、Blinらの方法（Blin et al., Nucleic Acids Res. 3: 2303 (1976)）等により、また、RNAの抽出については、Favaloroらの方法（Favaloro et al., Methods Enzymol. 65: 718 (1980)）等により行うことができる。更には、鎖状若しくは環状のプラスミドDNAや染色体DNA、これらを制限酵素により若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA、あるいは、化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもできる。

【0014】

本発明では、生体高分子をそのまま中空繊維等に固定化してもよく、また、生体高分子に化学的修飾を施した誘導体や、必要に応じて変成させた生体高分子を固定化してもよい。

【0015】

例えば、生体高分子として核酸を用いる場合、核酸の化学的修飾には、アミノ化、ビオチン化、デオキシゲニン化等が知られており [Current Protocols In Molecular Biology, Ed.; Frederick M. Ausubel et al. (1990)、脱アイソトー

ブ実験プロトコール(1)DIGハイブリダイゼーション(秀潤社)]、本発明ではこれらの修飾法を採用することもできる。

【0016】

本発明において、生体高分子の固定化に用いることができる中空繊維としては、合成繊維、半合成繊維、再生繊維、天然繊維等が挙げられる。

【0017】

合成繊維の代表例としては、ナイロン6、ナイロン66、芳香族ポリアミド等のポリアミド系の各種繊維、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等のポリエステル系の各種繊維、ポリアクリロニトリル等のアクリル系の各種繊維、ポリエチレンやポリプロピレン等のポリオレフィン系の各種繊維、ポリビニルアルコール系の各種繊維、ポリ塩化ビニリデン系の各種繊維、ポリ塩化ビニル系繊維、ポリウレタン系の各種繊維、フェノール系繊維、ポリフッ化ビニリデンやポリテトラフルオロエチレン等からなるフッ素系繊維、ポリアルキレンパラオキシベンゾエート系の各種繊維などが挙げられる。

【0018】

半合成繊維の代表例としては、ジアセテート、トリアセテート、キチン、キトサン等を原料としたセルロース系誘導体系各種繊維、プロミックスと称される蛋白質系の各種繊維などが挙げられる。

【0019】

再生繊維の代表例としては、ビスコース法や銅-アンモニア法、あるいは有機溶剤法により得られるセルロース系の各種再生繊維(レーヨン、キュプラ、ポリノジック等)などが挙げられる。

【0020】

天然繊維の代表例としては、亜麻、苧麻、黄麻などが挙げられる。これらの植物繊維は、中空状の繊維形態を示すので本発明に用いることができる。

【0021】

天然繊維以外の中空繊維は、特殊なノズルを用いて公知の方法で製造することができる。ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン等は熔融紡糸法が好まし

く、ノズルとしては馬蹄型やC型ノズル、2重管ノズルなどを使用することができる。本発明においては、連続した均一な中空部を形成させることができる点で2重管ノズルを用いるのが好ましい。

溶融紡糸ができない合成高分子、半合成繊維又は再生繊維に用いられる高分子の紡糸は溶剤紡糸が好ましく用いられる。この場合も、溶融紡糸と同じく2重管ノズルを用いて、中空部に芯材として適切な液体を充填しながら紡糸することにより連続した中空部を有する中空繊維を得ることができる。

【0022】

本発明に用いる中空繊維あるいは多孔質中空繊維は、特にその形態が規定されるものではない。また、モノフィラメントであってもよく、マルチフィラメントであってもよい。

【0023】

本発明に用いる多孔質繊維は、溶融紡糸法又は溶液紡糸法に延伸法、ミクロ相分離法、抽出法などの公知の多孔化技術を組み合わせることにより得ることができる。

本発明に用いる多孔質繊維材料の多孔度は特に限定されるものではないが、繊維材料単位長さ辺りに固定化される生体高分子の密度を高めるという観点から、比表面積が大きくなるように高い多孔度であることが望ましい。

市販されている精密ろ過、限外濾過を目的とした多孔質中空糸膜、多孔質な中空糸膜の外表面に無孔性の均質膜を被覆した逆浸透膜、ガス分離膜、多孔質層の中間に無孔性の均質層を挟んだ膜などを用いることができる。

【0024】

本発明に用いる中空繊維あるいは多孔質中空繊維は、無処理の状態でそのまま用いてもよいが、必要に応じて、反応性官能基を導入したものであってもよく、また、プラズマ処理や γ 線、電子線などの放射線処理を施したものであってもよい。

【0025】

本発明の配列体は、中空繊維あるいは多孔質中空繊維を規則的に配列し、樹脂接着剤等で接着することにより、例えば、縦横に中空繊維あるいは多孔質中空繊維

維が整然と規則的に配列した三次元配列体を得ることができる。三次元配列体の形状は特に限定されるものではないが、通常は、繊維を規則的に配列させることにより正方形又は長方形に形成される。

「規則的に」とは、一定の大きさの枠の中に含まれる繊維の本数が一定となるように順序よく配列させることをいう。例えば、直径 1 mm の繊維を束にして断面が縦 10 mm、横 10 mm の正方形となるように配列させようとする場合は、その正方形の枠内 (1 cm^2) における 1 辺に含まれる繊維の数を 10 本とし、この 10 本の繊維を 1 列に束ねて 1 層のシートとした後、このシートが 10 層になるように重ねる。その結果、縦に 10 本、横に 10 本、合計 100 本の繊維を配列させることができる。但し、繊維を規則的に配列させる手法は、上記のようにシートを重ねるものに限定されるものではない。

【0026】

なお、本発明において三次元配列体とする中空繊維あるいは多孔質中空繊維の本数は 100 本以上、好ましくは 1,000~10,000,000 本であり、目的に応じて適宜設定することができる。但し、配列体における繊維の密度が、 1 cm^2 当たり 100~1,000,000 本となるように調製することが好ましい。そして、高密度に生体高分子が固定化された繊維配列体の薄片シートを得るべく繊維を配列させるためには、繊維の太さは細い方が好ましい。本発明の好ましい実施態様においては、配列体を構成する繊維軸方向に対して垂直な断面 1 cm^2 当たり 100 本以上の中空繊維あるいは多孔質中空繊維を含むものである。これを達成するためには 1 本中空繊維あるいは多孔質中空繊維の外径は 1 mm 以下であることが必要である。

【0027】

例えば、外径が 500 μm 程度の中空繊維あるいは多孔質中空繊維のモノフィラメントを用いれば、固定化配列体断面 1 cm^2 あたり 400 以上の中空繊維あるいは多孔質中空繊維が配列された配三次元構造体を得ることができる。また、中空繊維紡糸技術を応用して外径が 30 μm 程度の中空繊維あるいは多孔質中空繊維を製造し、これを用いれば、固定化配列体断面 1 cm^2 当たり 100,000 本以上の中空繊維あるいは多孔質中空繊維が配列された三次元構造体を得るこ

とが可能である。

【0028】

本発明においては、配列体を構成する各中空繊維又は各多孔質中空繊維に対して樹脂で固定しない延長部分を設け、この先端部分を生体高分子を含む液槽に浸漬することにより、該液を配列体を構成する各繊維に導入することが可能となる。

【0029】

中空繊維あるいは多孔質中空繊維に生体高分子を固定化する方法としては、配列体を構成する各中空繊維あるいは多孔質中空繊維の中空部に生体高分子を含む液を導入した後、中空繊維あるいは多孔質中空繊維の内壁面等と生体高分子との間の各種化学的又は物理的な相互作用、すなわち、中空繊維あるいは多孔質中空繊維の内壁面等に存在する官能基と生体高分子を構成する成分との間の化学的又は物理的な相互作用を利用することができる。

例えば、アミノ基で修飾された核酸を中空繊維に固定化する場合には、グルタルアルデヒドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)等の架橋剤を用いて繊維の官能基と結合させることができる。

【0030】

また、生体高分子の中空繊維等への固定化は、生体高分子をゲルに固定化させてこのゲルを介して行うことができる。ここで用いることのできるゲルの種類は特に限定されず、例えば、アクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-アクリロイルアミノエトキシエタノール、N-アクリロイルアミノプロパノール、N-メチロールアクリルアミド、N-ビニルピロリドン、ヒドロキシエチルメタクリレート、(メタ)アクリル酸、アリルデキストリン等の単量体の1種類または2種類以上と、メチレンビス(メタ)アクリルアミド、ポリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート等との多官能性単量体を共重合したゲルを挙げることができる。

この場合の固定化は、生体高分子並びに上記単量体及び重合開始剤を含む溶液を中空繊維等の中空部に導入後、重合ゲル化させることによって行うことができる。

【0031】

前記配列体を構成する各中空繊維又は各多孔質中空繊維に対して樹脂で固定しない延長部分は、配列体の一端、好ましくは両端に設けることにより、生体高分子を含む液を導入する以外に必要な応じ種々の処理を行うことができる。例えば、熱処理、アルカリ処理、界面活性剤処理などを行うことにより、配列体を構成する中空繊維あるいは多孔質中空繊維の内壁面等に固定化された生体高分子を変成させる、あるいは、細胞、菌体などの生材料から得られた生体高分子を使用する場合は、不要な細胞成分などを除去することができる。なお、これらの処理は別々に実施してもよく、同時に実施してもよい。また、生体高分子を含む試料を配列体を構成する中空繊維あるいは多孔質中空繊維に固定化する前に、適宜実施してもよい。

【0032】

三次元列体中の各々の中空繊維あるいは多孔質中空繊維内部に固定化されている生体高分子の種類は、それぞれ異なる種類の生体高分子とすることが可能である。即ち、本発明によれば、固定化された生体高分子の種類と配列の順序に関しては、目的に応じて任意に設定することが可能である。

【0033】

本発明においては、三次元配列体を、繊維軸と交差する方向、好ましくは繊維軸に対して垂直方向に切断することにより、任意に配列された生体高分子固定化中空繊維配列体断面あるいは生体高分子固定化多孔質中空繊維配列体断面を有する薄片、すなわち生体高分子配列薄片を得ることができる。この際の切断方法としては、例えば、マイクロトームを用いて配列体から薄片を切り出す方法等が挙げられる。薄片の厚みに関しては任意に調整することができるが、通常1～5,000 μ m、好ましくは10～2,000 μ mである。

【0034】

得られた生体高分子固定化中空繊維配列体断面あるいは生体高分子固定化多孔質中空繊維配列体断面を有する薄片（生体高分子配列薄片）には、該配列体を構成する中空繊維あるいは多孔質中空繊維の数に応じた生体高分子が存在する。薄片の断面積当たりの生体高分子の数に関しては、用いる中空繊維あるいは多孔質

中空繊維の外径等を適宜選択することにより、薄片断面積 1 cm^2 あたり 100 個以上の生体高分子が固定化された薄片を作製することが可能であり、更には、薄片断面積 1 cm^2 あたり 1000 個以上の生体高分子が固定化された薄片を作製することも可能である。

また、同一配列体から得られる薄片の生体高分子の位置配列はすべて同一であるので、同一配列体から得られるすべての薄片の生体高分子の位置配置がわかる。

【0035】

得られた生体高分子固定化中空繊維配列体断面あるいは生体高分子固定化多孔質中空繊維配列体断面を有する薄片、すなわち生体高分子配列薄片は、例えば固定化された生体高分子が核酸である場合、該核酸をプローブとして、検体と反応させてハイブリダイゼーションを行うことにより、検体中の特定のポリヌクレオチドの塩基配列の検出に用いることができる。

【0036】

本発明で言うプローブとは、広義には検体中に存在するタンパク質や低分子化合物等の検体試料側生体高分子と特異的に結合することができる固定側生体高分子を指す。従って、これらの薄片の利用法としては、固定化された生体高分子（プローブ）とハイブリッドを形成する検体試料側生体高分子を検出するための利用に留まらず、固定化された生体高分子と特異的に結合するタンパク質や低分子化合物等の各種試料を検出するための利用が挙げられる。

固定化された生体高分子が核酸である場合には、本発明による生体高分子配列シートを検体と反応させてハイブリダイゼーションを行い、プローブと相補的な検体中に存在する核酸とのハイブリッドを形成させ、このハイブリッドを検出することにより、目的とする塩基配列を有する検体中の核酸を検出することができる。

【0037】

ハイブリッドの検出の場合には、ハイブリッドを特異的に認識することができる公知の手段を用いることができる。例えば、検体中の生体高分子に、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープなどの標識体を作用させ、この標識体を検出す

ることができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法等に関しては、何ら制限されることはなく、従来公知の各種手段を用いることができる。

【0038】

【実施例】

本発明を以下の実施例によって更に詳細に説明する。但し、本発明はこれら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

【0039】

実施例 1

中空繊維配列体の作製 (1) :

1 cm² 四方に縦横各々 20 個、合計 400 個の孔が規則正しく正方配列された繊維ガイド板 2 枚を用い、その繊維ガイド板の各孔にナイロン製中空繊維 (外径約 300 μm、長さ約 50 cm) 400 本を通過させることにより中空繊維配列体を得た。

2 枚の繊維ガイド板の間隔を 20 cm とし、その間をポリウレタン樹脂により固定化することにより、両端に樹脂で固定化されない部分を有する中空繊維配列体を得た。

【0040】

実施例 2

中空繊維配列体の作製 (2) :

ナイロン製中空繊維の代わりに、ポリエチレン-ビニルアルコール共重合体で内表面を親水化処理したポリエチレン製中空繊維 (外径約 300 μm、長さ約 50 cm) を用いて、実施例 1 と同様の方法により、両端に樹脂で固定化されない部分を有する中空繊維配列体を得た。

【0041】

実施例 3

多孔質中空繊維配列体の作製 :

ナイロン製中空繊維の代わりに、無孔質な中間層を有するポリエチレン製多孔質中空糸膜 MHF 200 TL (三菱レイヨン株式会社製、外径 290 μm、内径 200 μm、長さ約 50 cm) を用いた以外は、実施例 1 と同様に実施し、両端

に樹脂で固定化されない部分を有する多孔質中空繊維配列体を得た。

【0042】

実施例 4

中空繊維の内表面処理 (1) :

実施例 1 で得られた中空繊維配列体を構成する各中空繊維の中空部に、一方の樹脂で固定化されない繊維部分から蟻酸を導入し、1 分間保持した。次に、中空部に室温の水を多量に導入して十分洗浄し、その後、乾燥することによりナイロン製中空繊維の前処理を行った。

【0043】

実施例 5

中空繊維の内表面処理 (2) :

蟻酸の代りに、硫酸の 10 % エタノール溶液を用いた以外は、実施例 3 と同様に実施し、ナイロン製中空繊維の前処理を行った。

【0044】

参考例 1

5' 末端にアミノ基を有するオリゴヌクレオチドの合成 :

以下に示したオリゴヌクレオチド (プローブ A、プローブ B) を合成した。

プローブ A : GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC (配列番号 1)

プローブ B : GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (配列番号 2)

オリゴヌクレオチドの合成は P E バイオシステムズ社の自動合成機 DNA/RNA synthesizer (model 394) を用いて行い、DNA 合成の最終ステップでアミノリンク I (商標名) (アプライドバイオシステム社) を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの 5' 末端に $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ を導入し、一般的手法により、脱保護及び精製して使用した。

【0045】

実施例 6

中空繊維配列体への生体高分子の導入及び固定化 (1) :

実施例 1 で作製した中空繊維配列体に対して実施例 2 及び 3 により各構成中空繊維の内表面処理を行った後、生体高分子の一例として、参考例 1 において合成

したアミノ基を有するオリゴヌクレオチド（プローブA及びプローブB）を、以下の方法により中空繊維配列体を構成する各中空繊維内部に導入し、固定化した。

中空繊維配列体の一方の端より、リン酸カリウム溶液緩衝液に参考例1において合成したアミノ基を有するオリゴヌクレオチドを加えた溶液を導入した後、20℃で終夜保持した。

その後、リン酸カリウム溶液緩衝液、塩化カリウム溶液、水で、中空繊維内部を洗浄し、オリゴヌクレオチドが中空繊維の内壁面に固定化された核酸固定化中空繊維配列体を得た。

この際に、プローブA及びプローブBのオリゴヌクレオチドは、中空繊維配列体における配列が図1の如くなるように導入し、固定化した。

図1において、白丸（○）は、プローブAが内部に固定化された中空繊維、黒丸（●）は、プローブBが内部に固定された中空繊維を表す。

【0046】

実施例7

中空繊維配列体への生体高分子の導入及び固定化（2）：

実施例2で作製した中空繊維配列体を用いて、実施例6と同様の方法により、オリゴヌクレオチドが中空繊維の内壁面に固定化された核酸固定化中空繊維配列体を得た。

この際にも、中空繊維配列体におけるプローブA及びプローブBのオリゴヌクレオチドの配列は、実施例6と同様である。

【0047】

実施例8

多孔質中空繊維配列体への生体高分子の導入及び固定化：

実施例3で作製した多孔質中空繊維配列体を用いて、実施例6と同様の方法により、オリゴヌクレオチドが多孔質中空繊維の内壁面に固定化された核酸固定化多孔質中空繊維配列体を得た。

この際にも、多孔質中空繊維配列体におけるプローブA及びプローブBのオリゴヌクレオチドの配列は、実施例6と同様である。

【0048】

実施例9

生体高分子配列シートの作製：

実施例6及び7で得られた生体高分子固定化中空繊維配列体、及び実施例8で得られた生体高分子固定化多孔質中空繊維配列体を、各々の繊維軸に直角方向に、ミクロトームを用いて約100 μ mの厚さに薄片を切り出すことにより、縦横各々20、計400のオリゴヌクレオチドが規則的に正方に配列された生体高分子配列薄片得た。(図2)

【0049】

参考例2

試料核酸の標識：

試料核酸のモデルとして、参考例1で合成したオリゴヌクレオチド（プローブA、プローブB）の配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチド（C、D）を合成した。

オリゴヌクレオチド C：GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG（配列番号3）

オリゴヌクレオチド D：CTGCTGTCCCAAACCTGACCTCCACC（配列番号4）

これらのオリゴヌクレオチドの5'末端を、参考例1と同様にしてアミノリンクII（商標名）（PEバイオシステムズジャパン社）を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの5'末端にNH₂（CH₂）₆-を導入した後、以下のようにしてディゴキシゲニン（ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社）で標識した。

末端アミノ化されたオリゴヌクレオチドをそれぞれ100mMホウ酸緩衝液（pH8.5）に終濃度2mMになるように溶かした。等量のDigoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocaproic acid-N-hydroxy-succinimide ester（26mg/1mlジメチルホルムアミド溶液）を加え、室温にて一晩静置した。

量を100 μ lに調整し、2 μ lのグリコーゲン（ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社）、10 μ lの3M酢酸ナトリウム（pH5.2）、300 μ lの冷エタノールを加え、15,000rpm 15分の遠心により沈殿を回収した。沈殿に500 μ lの70%エタノールを加え15,000rpm、5分の遠心により沈殿を再びチューブの底に集めた。沈殿を風乾し、100 μ lの10m

M Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA に溶かした。

こうして得られた DIG 標識オリゴヌクレオチドを試料核酸のモデルとして用いた。

【0050】

参考例 3

ハイブリダイゼーション：

実施例 9 で作製した各々のオリゴヌクレオチドが規則的に正方に配列された生体高分子配列シートをハイブリダイゼーション用のバッグに入れ、以下の組成からなるハイブリダイゼーション溶液を注ぎ込み、45℃で30分間プレハイブリダイゼーションを行った。

参考例 2 で得られた DIG 標識 DNA を加え、45℃で15時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション溶液組成：

5 × SSC (0.75 M 塩化ナトリウム、0.075 M クエン酸ナトリウム、pH 7.0)

5 % ブロッキング試薬 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)

0.1 % N-ラウロイルザルコシンナトリウム

0.02 % SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)

50 % ホルムアミド

【0051】

参考例 4

検出：

ハイブリダイゼーション終了後、オリゴヌクレオチドが規則的に正方に配列された生体高分子配列シートを、あらかじめ保温しておいた 50 ml の 0.1 × SSC、0.1 % SDS 溶液に移し、振盪しながら 20 分間の洗浄を 45℃で3回行った。

DIG 緩衝液 1 を加え、室温で振盪しながら SDS の除去を行った。これを再度繰り返した後、DIG 緩衝液 2 を加え 1 時間振盪した。緩衝液を除いた後、DIG 緩衝液 2 に 10000 分の 1 量の抗 DIG アルカリフォスファターゼ標識抗

体溶液を加えた溶液 10 ml を加え、30 分間ゆっくり振盪させることにより抗原抗体反応を行わせた。次に 0.2% Tween 20 を含む DIG 緩衝液 1 で 15 分間 2 回振盪することにより洗浄し、引き続き DIG 緩衝液 3 に 3 分間浸した。DIG 緩衝液 3 を除いた後、AMPPD を含む DIG 緩衝液 3 ml を加え、10 分間平衡化した。

水分をきり、新しいハイブリダイゼーション用バッグに移し、37℃で 1 時間おいた後、X 線フィルム用のバインダーに X 線フィルムとともに挟みフィルムを感光させた。

その結果、何れの生体高分子配列薄片も、プローブ A が配置された場所には、オリゴヌクレオチド C が結合し、プローブ B が配置された場所には、オリゴヌクレオチド D が結合していることが確認された。

DIG 緩衝液 1 : 0.1 M マレイン酸、0.15 M 塩化ナトリウム
(pH 7.5)

DIG 緩衝液 2 : DIG 緩衝液 1 に 0.5% 濃度でブロッキング試薬を
添加したもの

DIG 緩衝液 3 : 0.1 M トリス-塩酸 (pH 9.5)、0.1 M 塩化
ナトリウム、0.05 M 塩化マグネシウム

ブロッキング試薬 : 抗 DIG アルカリフォスファターゼ標識抗体溶液および AMPPD は DIG Detection キット (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) 中の試薬である。

【0052】

【発明の効果】

本発明により、核酸、蛋白質、多糖類などの生体高分子が整然と配列されて固定化された薄片の製造方法が提供される。

本発明によれば、生体高分子が任意に高密度且つ正確に配列された生体高分子固定化中空繊維配列体あるいは多孔質中空繊維配列体の繊維断面を有する薄片、すなわち生体高分子配列薄片を再現性よく効率的に得ることができる。この生体高分子配列薄片を用いて、検体中の生体高分子の種類および量を調べることができる。

本発明を従来法と比較した利点、有用性としては、例えば、生体高分子整列化プロセスと固定化プロセスとを同一の二次元担体上で行わず、まず、繊維賦形技術により中空繊維の三次元配列体を作製し、この配列体に効率的に生体高分子を導入固定化することにより、生体高分子が整列して配列された三次元構造体を得、その構造体に対して、従来法にはない切断薄片化プロセスを経ることで、固定化生体高分子二次元高密度配列体を作製することが可能となり、従来のスポッティング法のような誤差の多い微量分注操作が不要となるとともに、連続切片化を通した多量生産が可能となったこと等があげられる。

【0053】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Rayon Co.,Ltd.

<120> Process for producing a slice of an array of biopolymer-fixed fibers

<130> P110401000

<160> 4

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Synthetic DNA

<400> 1

gcgatcgaaa ccttgctgta cgagcgaggg etc

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Synthetic DNA

<400> 2

gatgaggtgg aggtcagggt ttgggacagc ag

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Synthetic DNA

<400> 3

gagccctcgc tcgtacagca aggtttcg

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Synthetic DNA

<400> 4

ctgctgtccc aaaccctgac ctccacc

【 0 0 5 4 】

【配列表のフリーテキスト】

配列番号 1 : 合成DNA

配列番号 2 : 合成DNA

配列番号 3 : 合成DNA

配列番号 4 : 合成DNA

【 0 0 5 5 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本発明の中空繊維配列体の製造方法模式図である。

(1) は中空繊維配列体（樹脂で固定）、(2) は中空繊維（非固定）、(3) は生体高分子入り容器、及び(4) は連続面であることを示す。

【図 2】

図 2 は、本発明の中空繊維配列体の断面図の模式図である。

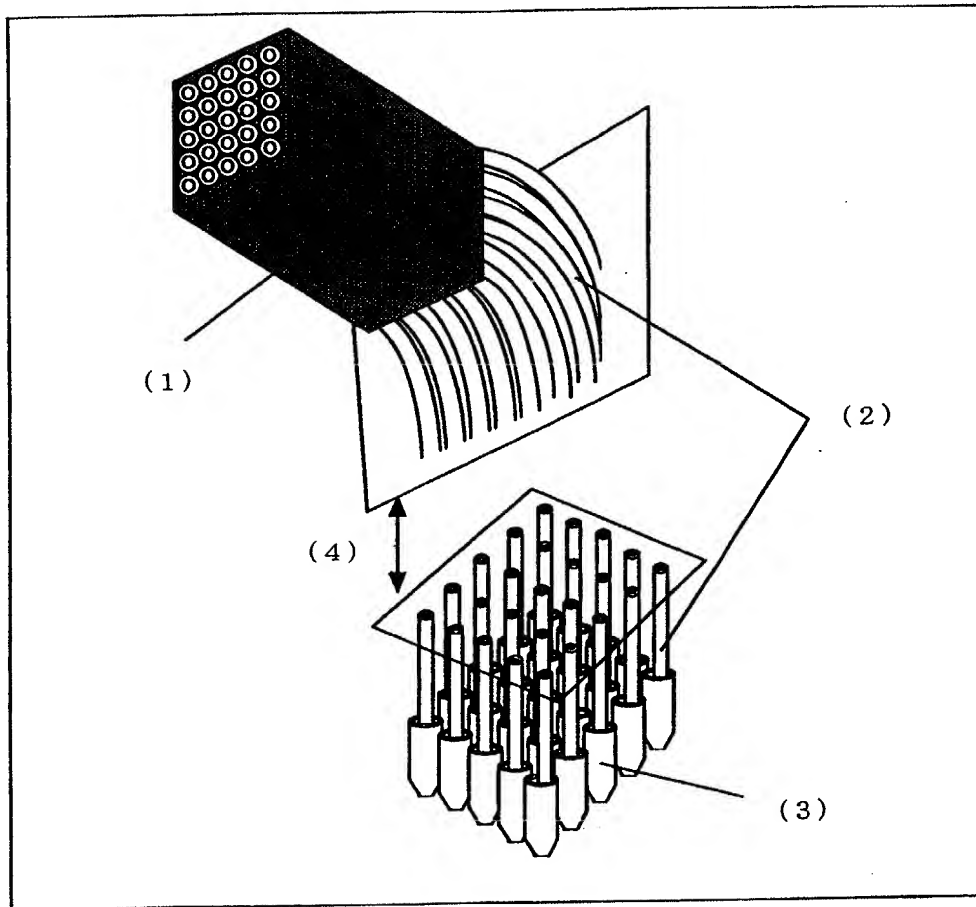
特平 1 1 - 2 4 0 0 4 1

【図 3】

図 3 は、本発明の中空繊維配列体を、繊維軸に対して垂直方向にスライスして得られた生体高分子配列薄片の模式図である。

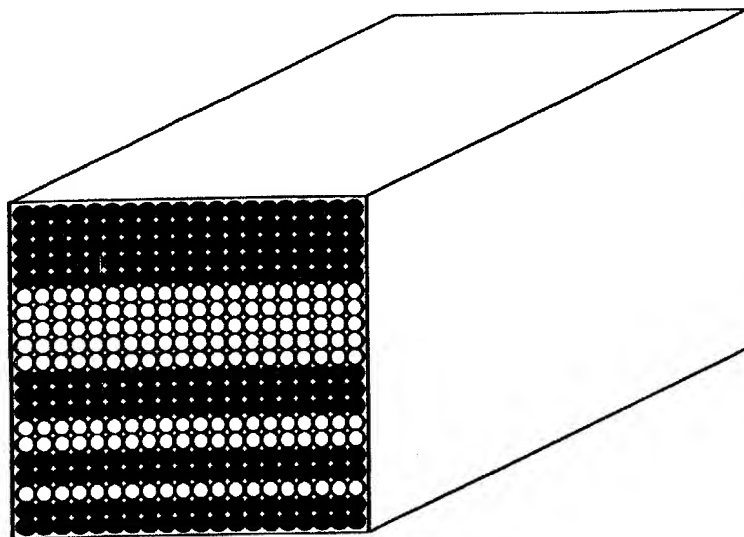
【書類名】 図面

【図 1】

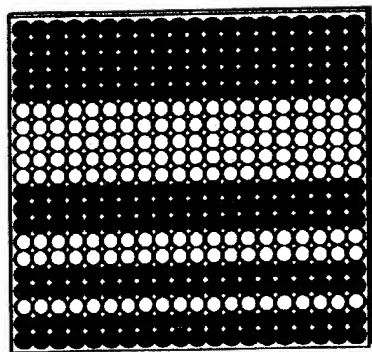


特平 1 1 - 2 4 0 0 4 1

【图 2】



【图 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 中空繊維または多孔質中空繊維を複数本束ねて配列体とし、次いで該配列体を構成する各繊維の内壁部、中空部、多孔質部等に生体高分子を固定化させた後、該生体高分子固定化配列体を繊維軸と交差する方向にスライスする生体高分子配列薄片の製造方法。

【効果】 生体高分子が任意に高密度且つ正確に配列された生体高分子固定化中空繊維配列体または多孔質中空繊維配列体の繊維断面を有する薄片を再現性よく効率的に得ることができる。この生体高分子配列薄片を用いて、検体中の生体高分子の種類および量を調べることができる。

【選択図】 なし

特平11-240041

出願人履歴情報

識別番号 [000006035]

1. 変更年月日 1998年 4月23日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都港区港南一丁目6番41号
氏 名 三菱レイヨン株式会社